

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06357

研究課題名（和文）有性生殖を介した抗酸菌進化モデルの実験と集団ゲノミクスによる検証

研究課題名（英文）Addressing a model of mycobacterium evolution via sexual reproduction: approaches by molecular genetics and population genomics

研究代表者

矢野 大和 (Yano, Hirokazu)

東北大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：20646773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：データベースに登録済みのMAH世界分離株125株分の染色体配列データを対象として遺伝的集団構造解析や連鎖検出解析などを行い、組換えを頻繁に行う系統と組換えをあまり行わない系統の2系統が同じ地域に生息し、それらが“交配”していることをゲノム情報学的に明らかにした。さらに組換えのコールドスポットに注目することで、環境分離株の迅速な系統予測に利用可能なマーカー遺伝子を発見した。M. aviumがプラスミドDNAを保有している証拠を得、臨床株5株の完全ゲノム配列をエラー補正したのち公開した。プラスミドを基本骨格とするベクター作成方法に関するアイデアを記載した総説を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸菌の一種Mycobacterium avium (MAC菌)は難治性の肺MAC症の原因菌である。日本で社会問題となっているM. aviumが組換えを行う菌種であることはゲノム情報から推察されているものの、実験による再現が報告されていない。本研究は日本のM. aviumがどのような条件で何の遺伝子を交換しているのかを解明することを見据え、それを実現するための実験系構築とデータセット構築を目指したものである。得られる情報は今後のM. aviumを用いた分子遺伝学実験や細菌GWAS研究に有用な知見を提供すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed population structure of M. avium subsp. hominisuis (MAH) using publicly available genomic data, then detected exchanges of chromosomal fragments between two lineages one carrying many recombination footprints and the other carrying little. We found a recombination-cold region on the MAH chromosome, wherein the polymorphism can be used as lineage markers for genotyping. We released complete genome sequences of 5 MAH strains after polishing sequences. We obtained evidence that MAH carry plasmids.

研究分野：遺伝学

キーワード：抗酸菌 プラスミド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの細菌種の地域多様化の研究は、特定宿主との共存に特化した菌種が研究対象とされてきた。私たちは、病原菌としても知られるが、主に自然環境や浴室に生息している非結核性抗酸菌の1グループ *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) のゲノムを初めて集団規模で比較し、本種が大規模な染色体断片の交換を行っているという証拠を得ていた (Yano et al., *Genome Biol Evol* 2017)。MAH の分子遺伝学的研究例はこれまでになく、本種が染色体間の組換えをどのような機構で行っているのかは不明であった。同じ抗酸菌でもヒト感染に特化した結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、4 万年前の共通祖先成立後、組換えをほとんど行わずに世界に広がり地域多様化を遂げたというのが定説で、MAH と対照的である。細菌の DNA 交換手段として、自然形質転換 (細胞外 DNA の取り込み)、プラスミドを介した接合、ウイルスを介した普遍形質導入が提案されている。ウイルスが全ての MAH 分離株周辺に存在しているとは考えにくく、MAH は形質転換やウイルス以外の手段 (すなわち接合) を用いて長い染色体断片を交換していると推測された。また、代表者は集団遺伝学的手法を用いて世界に分布する MAH の 5 系統を定義していた。東アジア 2 系統とそれ以外の系統間で細胞外糖脂質成分の一つであるトレハロースの合成に関与するオペロンの配列が大きく異なっていること、また、その領域が集団内で水平伝達されていることを情報科学的に発見していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、真核生物の有性生殖に対応する「接合を介したゲノムワイドにおこる組換え」によって、MAH が進化しているという仮説の妥当性を実験と集団ゲノム解析により検証することを目的とする。研究開始当初 (a) MAH の有性生殖の実証 (b) 東アジア型対立遺伝子の機能解析 (c) 「シャワー水」分離株集団ゲノム解析という独立した 3 つの課題を設けていた。しかし、研究開始後 MAH の分子遺伝学実験の困難さに直面したため研究計画を一部変更した。そのため課題は (1) 増加したゲノムデータを用いた MAH の遺伝的集団構造の解明 (2) 形質導入実験が可能なモデル細菌株のスクリーニング (3) ロングリードとショートリードを用いたリファレンスゲノム作成となっている。浴室分離株集団ゲノム解析と GWAS は次回の研究課題に持ち越された。

## 3. 研究の方法

- MAH 世界集団の遺伝的集団構造の解析

2017 年に発表した論文では 35 株のゲノム情報のみが利用可能であったが、2018 年 2 月の段階で 125 株のデータが PATRIC データベースに登録されていた。これらをダウンロードした。TH135 株の染色体配列 (Genbank accession no. AP012556.1) をリファレンスとして、Parsnp (Treangen et al., *Genome Biol.* 2014;15:524) を用いてアライメント作成可能部分の SNP (48,972 サイト) をリストした。この SNP のアライメントを BAPS (v6) の mixture analysis および admixture analysis に提供した。さらに TH135 ゲノムの対応するサイトに各株の SNP を埋め込んだ仮想ゲノムを 125 株分作成して、それを fastGEAR (Mostowy et al., *Mol Biol Evol.* 2017;34:1167-82) による自由交配集団(分集団/Sequence Cluster(SC)) の検出とゲノム連鎖解析

に基づいた lineage の推定に使用した。本解析の最中に、偶然、組換えのコールド領域を発見した。より定量的な評価をするため、Ordered painting(Yahara et al., Mol Biol Evol. 2014;31:1593–605)を用いて、染色体上の多型サイトごとに組換え強度の定量化をした。種の判別に使われる 16SrRNA 遺伝子のように、系統マーカーとなる遺伝子を探すため、R パッケージ PopGenome (Pfeifer et al., Mol Biol Evol. 2014;31:1929–1936) を利用して、組換えのコールド領域にあるコア遺伝子を対象に、遺伝子アライメントの Haplotype diversity (H), Nucleotide diversity (pi) を算出した。コア遺伝子の抜き出しは Roary v 3.7.0 (Page et al.,2015;31:3691–3693)、遺伝子アライメント作成には PRANK v.150803 (Löytynoja A, Goldman N. BMC Bioinformatics. 2010;11:579) を使用した。

- 形質導入実験が可能なモデル細菌株のスクリーニング

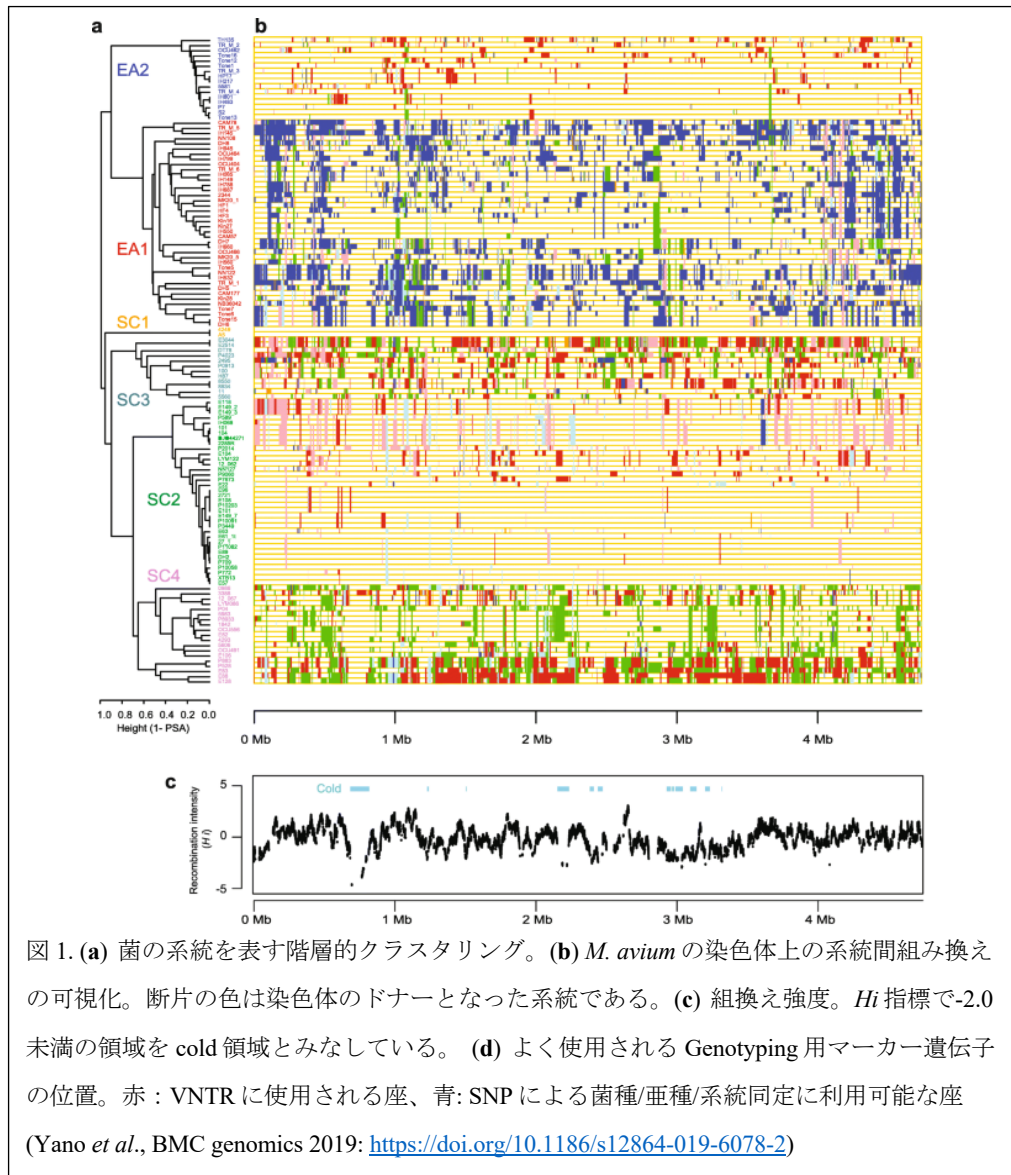
アルバートアインシュタイン大学から分与していただいたトランスポゾンファージ phAE180 が感染して効率よくプラークを作成する株を得ようとした。ファージの調整は *Mycobacterium protocols* (Parish and Brown 編 Humana Press 2009; ISBN: 978-1-59745-207-6) に記載の方法に倣い、*Mycobacterium smegmatis* MC<sup>2</sup>155 株を溶菌させて得られたファージを使用した。解析対象は、浴室由来の 45 株および臨床株 2 株である。細菌株のファージ感受性はファージのスポットテストで評価した。

#### 4. 研究成果

- MAH 世界集団の遺伝的集団構造の解析

細菌の GWAS 研究をする上で、データセットをデザインする際、データセット内にどのような系統が出現するか予測できた方がよい。代表者が GWAS 研究で設定する問題は、浴室あるいは人というニッチに関連する細菌ローカス/アレルは何かであるが、その際、データセット内の細菌株は同じ系統に属していた方が、ニッチ関連する細菌ローカス/アレルをピンポイントで見つけやすくなる。そのため、2018 年時点で増加した公開ゲノムを利用して世界の MAH の集団構造を再び把握しておく必要があった。代表者は、2018 年 2 月の段階で PATRIC データベースに登録されていた 125 株のデータを元にして、コアゲノム上に出現する 48,972 サイトの SNP を取り出し、BAPS(v6)による分集団推定を行った。MAH の世界集団は 6 つの分集団 (MahEastAsia1(EA1), MahEastAsia2(EA2), SC1, SC2, SC3, SC4) にわけられた。次に、SNP のポジション情報を利用して、過去に起こった組換えで置き換わった染色体断片の単位 (連鎖) を推定し、2 株で共有している染色体断片の割合をもとにゲノムの関連性を評価する fastGEAR 法により、集団内の系統を定義した (図 1)。この解析の結果 BAPS 解析から推定された分集団に対応する 6 つの系統が推定された(図 1(a))。過去の研究よりもデータセットサイズが増えたことで、染色体の 0.8 Mbp ポジションあたりでは系統間の組換えが起きる回数は少ない、という特徴が見えてきた (図 1(b))。組換えがおきる頻度が少ないということは、その領域に SNP があれば、それらは特定の系統に固定されているということになる。そこで全ゲノムシーケンシングをしなくても菌株の系統推定ができるようなマーカー遺伝子を、染色体アライメントに対する組換え強度解析 (OrderedPainting)、遺伝子アライメントの Haplotype diversity (H) と Nucleotide diversity (pi) を指標にして探した。その結果、SC2 と SC4 を 1 つの系統とみなした場合、TH135 株の MAH\_0788 (cytochrome P450)の遺伝子のアライメントにおいて、概ね遺伝子配

列が各系統ごとにユニークになり、かつ系統内では多様性がほとんどないことがわかった。よってこれらの遺伝子を系統マーカー遺伝子として提案した (Yano *et al.*, BMC genomics 2019)。



- 形質導入実験が可能なモデル細菌株のスクリーニング

健康者浴室由来の 45 株、臨床株 2 株、TM4 ファージの宿主として知られる *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 のプラーク形成実験の結果の例を図 2 に示した。ポジティブコントロールの *M. smegmatis* にスポットした際、プラーク形成が確認できた (図 2 左上)。これに対して、MAH の日本分離株にファージをスポットした際は、高濃度の TM4 ファージをスポットした場所では、MAH の増殖阻害が確認される株もあったが (図 2 左下)、ファージのバーストにより形成されるクリアゾーン(プラーク)形成自体はいずれの株でも確認できなかった。このことから、日本に分布している EA1 系統や EA2 系統に属する MAH は、細胞内での TM4 ファージの増殖を抑制する何らかの機構を有していると推定された。以上の結果から、*M. avium* の有性生殖の実証のためには、さらなるモデル細菌株のスクリーニングあるいは、ファージの改変の検討が必要であることがわかった。

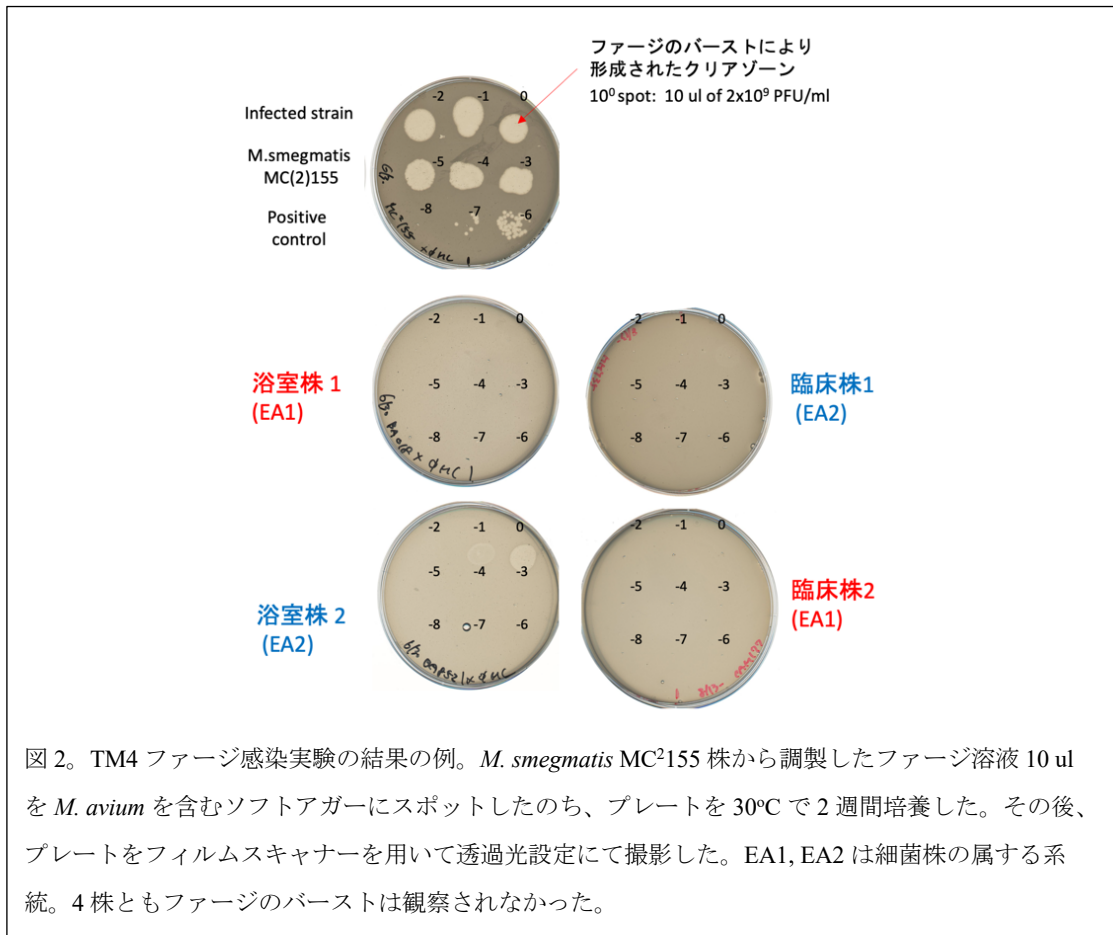


図2。TM4 ファージ感染実験の結果の例。 *M. smegmatis* MC<sup>2</sup>155 株から調製したファージ溶液 10 ul を *M. avium* を含むソフトアガーにスポットしたのち、プレートで 30°C で 2 週間培養した。その後、プレートをフィルムスキャナーを用いて透過光設定にて撮影した。EA1, EA2 は細菌株の属する系統。4 株ともファージのバーストは観察されなかった。

- ロングリードとショートリードを用いたリファレンスゲノム作成

過去の研究で公開した MAH4 株 (HP17, OCU873s\_P7\_4s (Yano et al 2017 内の記載は P7 株), OCU901s\_S2\_2s (S2 株), OCU464) のゲノム配列は PacioRSII ロングリードのみを利用した配列であり、イルミナリードによるエラー補正がされていなかった。また CAM177 株の登録アセンブリー配列はショートリードのみを利用して得られたアセンブリーであったので、contig の数が多かった。すなわち、5 株のうち、いずれのゲノムの登録配列もリファレンスゲノムとしては適切とは言えない状態であった。そこで、3 株についてはすでに保有していたロングリードの配列を Flye 2.6 でアセンブリーし直し、さらにイルミナリードと Pilon 1.23、BWA 0.7.17 を用いてエラーの補正を行った。CAM177 株については受託解析により新たにロングリードを得た。OCU901s\_S2\_2s と CAM177 の Pacbio RSII リードについては Flye 2.6 より canu 1.8 と circlator 1.5.2 の組み合わせを使用した場合の方が、アセンブリー結果が良かったので、それらに株のゲノム配列については、canu/circlator によるアセンブル結果をイルミナリードで補正したものを最終版とした。これら 5 株の補正後完全ゲノム配列は NCBI で公開済みである。これにより *M. avium* が高い確率 (5 株のうち 4 株) でプラスミドを保有していることが判明した。これらのプラスミドの遺伝子を利用して、MAH に対応したクローニングベクターを作成できる可能性がある。そこでプラスミドバイオロジー分野において集積された知見をまとめ、プラスミドベクターの作成に必要な知識を総説として発表した (Yano et al. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17: 70-8. 2019: )。具体的には、集団内で安定なプラスミドベクターを構築するのであれば、(1) プラスミドベクターの G+C 含量は宿主染色体のそれにマッチしている、(2) プラスミドの分配に関わるサイトが含まれている、(3) multimer resolution に関わるサイトが含まれている、などの条件を満たす必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arikawa Kentaro, Ichijo Tomoaki, Nakajima Satomi, Nishiuchi Yukiko, Yano Hirokazu, Tamaru Aki, Yoshida Shiomi, Maruyama Fumito, Ota Atsushi, Nasu Masao, Starkova Daria A., Mokrousov Igor, Narvskaya Olga V., Iwamoto Tomotada	4. 巻 74
2. 論文標題 Genetic relatedness of Mycobacterium avium subsp. hominissuis isolates from bathrooms of healthy volunteers, rivers, and soils in Japan with human clinical isolates from different geographical areas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 103923 ~ 103923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2019.103923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yano Hirokazu, Suzuki Haruo, Maruyama Fumito, Iwamoto Tomotada	4. 巻 20
2. 論文標題 The recombination-cold region as an epidemiological marker of recombinogenic opportunistic pathogen Mycobacterium avium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-019-6078-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yano H, Shintani M, Tomita M, Suzuki H, and Oshima T	4. 巻 17
2. 論文標題 Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Comput. Struct. Biotechnol. J.	6. 最初と最後の頁 70-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.csbj.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野 大和, 西内 由紀子, 有川 健太郎, 大田 篤, 三木 真理, 丸山 史人, 木田 博, 北田 清悟, 岩本 朋忠
2. 発表標題 GWASアプローチによる肺MAC症の病態に関連する細菌側因子の探索
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirokazu Yano, Fumito Maruyama, Tomotada Iwamoto
2. 発表標題 Population evolution of recombinogenic opportunistic pathogen Mycobacterium avium
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野大和、永田裕二、丸山史人、西内由紀子、岩本朋忠
2. 発表標題 tRNAアレーを運ぶ線状プラスミドの発見
3. 学会等名 第13回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野大和
2. 発表標題 肺MAC症原因菌Mycobacterium aviumのゲノム疫学
3. 学会等名 第73回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野大和、丸山史人、西内由紀子、岩本朋忠
2. 発表標題 肺MAC症原因菌Mycobacterium aviumのゲノム疫学
3. 学会等名 第4回抗酸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirokazu Yano, Fumito Maruyama, Yukiko Nishiuchi, Tomotada Iwamoto
2. 発表標題 Local diversification of MAC lung disease agent Mycobacterium avium
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野大和、丸山史人、岩本朋忠
2. 発表標題 モザイクゲノム生物非結核性抗酸菌の集団進化
3. 学会等名 生命科学フロンティアミーティング 国立遺伝学研究所 2018年10月5日 - 7日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野大和、丸山史人、岩本朋忠
2. 発表標題 肺MAC症原因菌Mycobacterium aviumの地域多様化
3. 学会等名 第1回遺伝学会春季分科会 国立遺伝学研究所 2019年3月8日
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岩本 朋忠  (Tomotada Iwamoto)  (70416402)	神戸市健康科学研究所・感染症部・部長    (84505)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------